

بررسی مولکولی حضور ژن blaZ در جدایه‌های استافیلوکوک اورئوس جدا شده از نمونه‌های بالینی

محمدبکائیان¹، حامدطهماسبی^{2*}، جلال مردانه³، علیرضا محمدزاده³، جواد ادبی²

1. دانشیار، متخصص باکتری‌شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، عضو مرکز بیماری‌های عفونی-گرمسیری، زاهدان، ایران
2. دانشجوی کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
3. استادیار، متخصص باکتری‌شناسی پزشکی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران

چکیده

تاریخ دریافت: 96/5/12

تاریخ پذیرش: 96/08/06

اهداف: باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام پیوسته در حال گسترش است. مصرف بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در درمان عفونت‌های وابسته به استافیلوکوک اورئوس باعث ظهور سویه‌های دارای آنزیم بتالاکتاماز شده است. شناسایی و بررسی ویژگی‌های مولکولی این سویه‌ها در امر درمان و انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب، مؤثر است. هدف از این مطالعه بررسی مولکولار فراوانی سویه‌های استافیلوکوک مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام است.

مواد و روش‌ها: نخست، جدایه‌های جمع‌آوری شده از نمونه‌های بالینی با تست‌های بیوشیمیایی غربالگری شد. استافیلوکوک‌های اورئوس بعد از تعیین طیف مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بررسی و ارزیابی مولکولی شد.

یافته‌ها: از 496 ایزوله اخذ شده از نمونه‌های بالینی مختلف، 147 ایزوله استافیلوکوک اورئوس شناسایی شد. بیشترین مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، اوگازاسیلین و تتراسایکلین و کمترین مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک ونکومايسن بود. از 147 نمونه مورد بررسی نیز 143 نمونه دارای ژن blaZ بود که بیش از 97 درصد را به خود اختصاص داده بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده از تست‌های مولکولی، گسترش و شیوع سویه‌های حامل آنزیم بتالاکتاماز در شهر زاهدان بسیار بالاست. این امر سبب می‌شود تا برای درمان همه عفونت‌های استافیلوکوکی تا حد امکان از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام استفاده نشود تا در کنار دسترسی به درمان سریع از افزایش سویه‌های مقاوم جلوگیری کرد.

کلیدواژه‌ها:

استافیلوکوک اورئوس، بتالاکتام، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، blaZ.

مقدمه

رنگدانه طلایی در آن، استاف طلایی خوانده می‌شود. این باکتری اورگانیزمی است که بعد از اشریشیاکلی، در مقام دوم ایجاد عفونت‌های بیمارستانی قرار دارد [2]. این باکتری دارای خصوصیتی است که آن را از سایر گونه‌های این جنس متمایز

استافیلوکوک اورئوس کوکسی فاقد تحرک با قطر تقریبی 0/8-0/1 میکرون در سه محور تقسیم و سبب ایجاد دسته‌جات نامنظم خوشه انگوری می‌شود [1]. به دلیل وجود

* نویسنده مسئول: حامدطهماسبی

نشانی: زاهدان - دانشگاه علوم پزشکی زاهدان - دانشکده پزشکی

تلفن: 09183195645، دورنگار: 0541-3425732

رایانه: ghaderassar@yahoo.com

شناسه ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9257-4479

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دوره 25، شماره 1، فروردین و اردیبهشت 1397، ص 31-37.

آدرس سایت: <http://jsums.medsab.ac.ir> رایانه: journal@medsab.ac.ir

شاپای چاپی: 1606-7487

پرداختیم. چون گاه ممکن است برخی سویه‌های استافیلوکوک اورئوس نسبت به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین حساس باشد، حامل ژن blaZ است. از این‌رو، شناسایی این موارد با روش‌های مولکولی راهی دقیق در درمان عفونت‌های مقاوم به بتالاکتام‌هاست.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

در این مطالعه توصیفی-مقطعی، طی دوره‌ای 9 ماهه، 470 نمونه از بیماران بستری در بخش‌های مختلف و بیماران مراجعه کننده به مراکز درمانی دانشگاه علوم پزشکی شهر زاهدان در سال 1394 جمع‌آوری شد. سپس، نمونه‌های جمع‌آوری شده داخل میکروتیوب‌های پلاستیکی دردار حاوی محیط ترانسپورت BHI با 10 درصد گلیسرول تلقیح و برای انجام آزمایش‌های تکمیلی و تشخیصی دقیق‌تر به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان منتقل شد. تا زمان انجام آزمایش‌ها، نمونه‌ها در دمای 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جداسازی، شناسایی و کشت باکتری‌ها

نمونه‌های به‌دست‌آمده روی محیط Blood Agar پایه و غنی‌شده با 5 درصد خون تازه گوسفندی به‌صورت خطی کشت داده و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه انکوبه شد. پس از مشاهده کلنی‌ها، رنگ‌آمیزی گرم انجام و کوکسی‌های گرم مثبت جداسازی شد. برای اینکه بتوان استافیلوکوک‌ها را از استرپتوکوک‌ها تفريق داد، از تست کاتالاز استفاده شد. برای تشخیص استافیلوکوک‌ها از میکروکوک‌ها هم از آزمایش اکسایش و احیا (OF(Oxidation and Fermentation) test استفاده شد.

بررسی الگوی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی

تعیین حساسیت ایزوله‌های بالینی به هفت آنتی‌بیوتیک بتالاکتام شامل پنی‌سیلین 10 میکروگرم، سفوکسیتین 30 میکروگرم، اوگزاسیلین 1 میکروگرم، سفتریاکسون 30 میکروگرم، سفوتاکسیم، سفازولین 30 میکروگرم و سفالکسین 30 میکروگرم (همگی ساخت شرکت Mast انگلستان) با استفاده از روش Kirby-Bauer Disk Diffusion انجام شد. در این روش، سوسپانسیونی از باکتری با کدورتی معادل ۵/۰ مک‌فارلند در محیط مایع مولر-هینتون آگار (ساخت کشور mast انگلستان) تهیه و با سواب استریل روی سطح آگارمولر-

کرده است. یکی از شاخصه‌های این باکتری دیواره سلولی آن است، شامل سه قسمت پپتیدوگلیکان، اسید تايكوييك و پروتئين A [3]. آنتی‌بیوتیک‌ها برای اعمال اثر خود، سازوکارهای متفاوتی دارند. یکی از این آنتی‌بیوتیک‌ها گروه بتالاکتام‌هاست که بر دیواره سلولی باکتری مؤثر است [4]. مصرف بیش‌ازحد بتالاکتام‌ها برای از بین بردن عفونت‌های استافیلوکوکی زمینه‌ساز ایجاد مقاومت در سویه‌های جدید می‌شود [5].

ظهور استافیلوکوک‌های اورئوس مقاوم به بتالاکتام برای نخستین بار در سال 1941 از نمونه‌های بیماران بستری در بیمارستان جداسازی و در سال 1970 سویه‌های مقاوم به پنی‌سیلین در بینی افراد شاغل در بیمارستان شناسایی شد [6]. سویه‌های استافیلوکوک اورئوس مقام به پنی‌سیلین در سال 1950 برای نخستین بار در حیوانات گزارش شد که مربوط به تورم پستانی استافیلوکوکی بود [7]. آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی با هدف قراردادن دیواره سلولی باکتری، طی فرایندهایی چندگانه زمینه تخریب دیواره سلولی باکتری را فراهم می‌کند [8]، به این صورت که در مرحله نخست، طی اتصال به پروتئین‌هایی به نام پروتئین متصل‌شونده به پنی‌سیلین (PBP) که در دیواره سلولی باکتری وجود دارد اتصال اولیه آنتی‌بیوتیک حاصل می‌شود [9]. سپس، با مهار ترانس‌پپتیدازها، ترانس‌پپتیدشدن را از کار می‌اندازد که به معنای ایجاد اتصال متقاطع در ساخت پپتیدوگلیکان‌های دیواره سلولی باکتری است [10]. در نهایت، آنزیم‌های اتولیتیک که هیدرولازهای مورین نام دارد (مورین مترداف پپتیدوگلیکان است) و در باکتری‌های در معرض پنی‌سیلین قرار می‌گیرد فعال می‌کند و موجب تخریب پپتیدوگلیکان و در آخر سبب از بین رفتن دیواره سلولی باکتری می‌شود [11].

سازوکار مقاومت به بتالاکتام‌ها، از بین بردن حلقه بتالاکتام در آنزیمی اختصاصی به نام بتالاکتاماز است. پروتئین‌های این آنزیم را ژن‌های متعددی کد می‌کند. یکی از این ژن‌ها، ژن blaZ است [12]. اصول شناسایی سویه‌های مقاوم به پنی‌سیلین روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی را استوار می‌کند [13]. برای از بین بردن خطاهای احتمالی در روش‌های فنوتیپی، می‌توان از روش ژنوتیپی وابسته به بررسی‌های مولکولار و ردیابی ژن‌های مورد نظر استفاده کرد. برای این کار با تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز یا (Polymerase Chain Reaction) PCR می‌توان ژن blaZ را شناسایی کرد [14]. در این مطالعه، با بررسی جدایه‌های استافیلوکوک اورئوس به‌دست‌آمده از نمونه‌های بالینی مختلف، به بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی سویه‌های مقاوم به بتالاکتام‌ها به‌خصوص پنی‌سیلین

هینتون تلقیح شد. سپس، برای به حداقل رساندن آلودگی، دیسک‌ها با فواصل مناسب با دستگاه Disc Dispenser (ساخت شرکت Mast انگلستان) روی سطح پلیت قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای 35°C ، قطر هاله‌های عدم‌رشد با استفاده از آخرین نسخه مؤسسه استاندارد بالینی و آزمایشگاهی (Clinical and Laboratory St CLSI: andards Institute) بررسی شد.

استخراج ژنومی

ایزوله‌های بالینی تأییدشده با آزمایش‌های بیوشیمیایی ذخیره‌شده در -20°C درجه سانتی‌گراد روی محیط بلاد آگار پایه (شرکت Merck آلمان) با ۵ درصد خون گوسفند کشت داده و در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد.

چند کلنی از هر ایزوله کشت‌داده‌شده به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت لوریا برتانی برات (شرکت Merck آلمان) درون لوله‌های دردار شیشه‌ای شماره‌گذاری شده تلقیح و به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شد. سپس، به مدت ۲۰ ساعت در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. $1/5$ سی‌سی از محیط کشت حاصل، درون میکروتیوب‌های دردار $1/5$ سی‌سی پلاستیکی ریخته و مراحل استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج شرکت سینا ژن (Cat. No.PR881614) بر اساس پرتکل شرکت سازنده انجام شد. DNA به دست آمده در دمای -20°C درجه سانتی‌گراد برای انجام آزمون‌های مولکولی ذخیره شد. انجام PCR با DNA استخراج‌شده و PCR مستقیم برای شناسایی ژن blaZ از پرایمر زیر استفاده شد.

جدول ۱. فهرست پرایمر مورد استفاده به همراه مشخصات آن‌ها

ژن‌های مورد نظر	پرایمر	طول توالی	اندازه (جفت باز)	رفرنس
blaZ	blaZ F	TCAACTGTAATATCGGAGGG AGGAGAATAAGCAACTATATCATC	310	سیدو و همکاران [15]

برای انجام واکنش PCR، ۲۵ میکرولیتر از محلول نهایی شامل ۱ میکرولیتر از DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۲۰ پیکومولار و $12/5$ میکرولیتر از مستر میکس (شرکت Ampliqon آلمان) استفاده شد (محتویات مستر میکس شامل Tris-Hcl، $\text{PH}8.5$ ، $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ ، 3mM MgCl_2 ، $0/2\%$ Tween20، $0/4\text{mM}$ dNTP، $0/2$ unit Ampliqon polymeras، Insert red به حجم نهایی از آب مقطر دیونیزه استفاده شد. از مخلوط PCR فاقد DNA الگو برای کنترل منفی استفاده شد [14]. سپس، آزمون PCR برای ژن blaZ با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (BioRad آمریکا)، بر اساس پروتکل دمایی جدول ۲ انجام شد.

جدول ۲. سیکل دمایی انجام واکنش PCR برای ژن‌های مورد نظر

مراحل	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (ثانیه)	تعداد سیکل
شوگ حرارتی اولیه	94	180	1
جداشدن قطعات DNA	94	45	30
جفت شدن پرایمرها	55	60	
طویل شدن پرایمرها	72	90	
طویل شدن نهایی	72	420	1

CCD-Tab1 ساخت کیاژن ایران) بررسی و از آن عکس تهیه شد (شکل ۱). از مارکر ۱۰۰ bp فرمنتاز (شرکت Thermofisher آمریکا) برای شناسایی طول باند مورد نظر استفاده شد.

نتایج

از مجموع ۱۴۷ ایزوله استافیلوکوک اورئوس جداشده از نمونه‌های بالینی، ۱۴۳ ایزوله حامل ژن بتالاکتاماز بود. الگوی

الکتروفورز روی ژل آگارز

بعد از تهیه ژل آگارز $1/5$ درصد با بافر TBE تهیه شده با غلظت $0/5$ درصد، ۶ میکرولیتر از محصول نهایی PCR در بافر $0/5\text{X}$ الکتروفورز شد. برای مشاهده دقیق باندها از ژل با درصد غلظت بالا استفاده شد. ۵ میکرولیتر محلول Gel Red (ساخت Biotium آمریکا) هنگام تهیه ژل به آن اضافه شد. نتیجه نهایی با دستگاه Gel Documentation (مدل

ایزوله‌ها مقاوم به سفوکسیتین 30 میکروگرم و 98/78 درصد نمونه‌های مقاوم به اوگزاسیلین 1 میکروگرم بود (جدول 3).

مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌دست‌آمده نیز به این صورت بود که پنی‌سیلین 10 میکروگرم با 100 درصد مقاومت و سفازولین 30 میکروگرم با 12/92 درصد مقاومت به‌ترتیب بیشترین و کمترین مقاومت را داشت. از این میان، 95/23 درصد از

جدول 3. الگوی مقاومت به برخی آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی در نمونه‌های بالینی استافیلوکوک اورئوس

آنتی‌بیوتیک	کد آنتی‌بیوتیک	حساس (درصد)	نیمه‌حساس (درصد)	مقاوم (درصد)	تعداد کل
سفوکسیتین	FOX30C	7	0	140 ٪ 95/23	147
اوگزاسیلین	OX1C	9 ٪ 6/13	0	138 ٪ 93/87	147
سفازولین	CZ30C	89 ٪ 87/08	0	19 ٪ 12/92	147
پنی‌سیلین جی	PG10C	0	0	147 ٪ 100	147
سیپروفلوکساسین	CIP5C	56 ٪ 38/09	12 ٪ 8/16	79 53/74	147
سفتراکسون	CRO30C	28 ٪ 19/04	0	119 ٪ 80/95	147
سفالکسین	CFX30C	66 ٪ 44/89	0	81 ٪ 55/10	147



شکل 1. نتیجه الکتروفورس ژل آگارز 1/5 درصد ژن blaZ. چاهک M مارکر 100bp، چاهک 1 تا 11 ایزوله‌های حامل ژن blaZ، چاهک 12 کنترل منفی برای ژن blaZ، چاهک 13 کنترل مثبت برای ژن blaZ

بحث

هیستاسونه و همکاران که شیوع این ژن را 98 درصد گزارش کرده بودند و مطالعات روساتو و همکاران که شیوع 96 درصدی از ژن blaZ به‌دست آوردند مشابه است [16]، [17]. الگوی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها هم مؤید این موضوع است که ایزوله‌های به‌دست‌آمده به بیشتر

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه مقاومت 100 درصدی به پنی‌سیلین و شیوع ژن blaZ در بیش از 90 درصد از ایزوله‌ها مشاهده شد که حاکی از بالابودن سویه‌های مقاوم به بتالاکتام‌ها در شهر زاهدان است. این نتایج با نتایج

پنی‌سیلین شناسایی می‌شود [23]. همچنین، از روش تعیین حداقل غلظت مهارری یا Minimum Inhibitory Concentration (MIC) نیز می‌توان به این نتیجه رسید، به‌طوری که اگر MIC جدایه‌های مورد بررسی بیش از 0/25 میکروگرم بر میلی‌متر باشد، مقاوم به پنی‌سیلین در نظر گرفته می‌شود [24].

با این حال، روش‌های فنوتیپی همیشه مشکلات مربوط به خود را دارد و در برخی موارد دارای مشکلاتی است که نتایج را به‌شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد [25]، از جمله نگهداری دیسک‌ها در شرایط مناسب و جلوگیری از عدم آلوده شدن آن‌ها هنگام استفاده و ذخیره‌سازی مجدد، آلوده شدن محیط‌های کشت هنگام کشت و دیسک‌گذاری، تأثیر منفی pH، تأثیر منفی افزایش یا کاهش بیش از حد دما در بیشتر مواقع، زمان‌بر بودن مشخص شدن نتایج که حداقل 24 ساعت و در برخی موارد 48 ساعت زمان نیاز است تا مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مد نظر مشخص شود [26-29]. از این‌رو، با توجه به اینکه در بازه زمانی این پژوهش تعدد مطالعات مشابه مطالعه حاضر در ایران بسیار کم بود و بیشتر گزارش‌های متفرقه با تست‌های فنوتیپی ارائه شده است، نمی‌توان مقایسه دقیق و جامعی با نتایج به‌دست‌آمده در پژوهش‌های داخلی داشت.

تشکر و قدردانی

با تشکر از کارشناسان آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی زاهدان و مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی-گرمسیری و کارشناس محترم این مرکز، خانم سپهری‌راد که ما را در انجام این طرح یاری کردند. این مقاله بخشی از طرح مصوب دانشگاه علوم پزشکی زاهدان با کد کمیته اخلاق به شماره 7152 است.

آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مقاومت دارد. در مطالعات چونگ و همکاران (2014) مقاومت بیشتر ایزوله‌های مورد مطالعه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی بود، به‌طوری که 92 درصد از ایزوله‌ها دارای ژن blaZ و مقاومت نسبت به سفازولین 35 درصد گزارش شده بود که بیش از مقدار گزارش شده در مطالعه حاضر است [18]. کمترین میزان مقاومت در این مطالعه مربوط به آنتی‌بیوتیک سفازولین بود که با مطالعه آسانت و همکاران همخوانی دارد [19].

بیشترین مقاومت‌های گزارش شده در مطالعه ما مربوط به پنی‌سیلین با 100 درصد مقاومت و سفوکسیتین و اوگزاسیلین با بیش از 90 درصد مقاومت بود که مشابه نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه جولیوس لی و همکاران است [20]. نتایج یو می وی و همکاران در مورد شیوع مقاومت سفازولین با داده‌های این مطالعه مشابهت داشت و بیشتر ایزوله‌ها حساس به این آنتی‌بیوتیک گزارش شده است [21]. چهار مورد از ایزوله‌های به‌دست‌آمده از نظر ژنوتیپی فاقد آنزیم بتالاکتاماز بود، اما از نظر فنوتیپی مقاومت به پنی‌سیلین را از خود نشان داد که نشان‌دهنده عدم اعتماد کامل به تست‌های فنوتیپی است. یک مورد از ایزوله‌های مورد آزمایش هم که از نظر ژنوتیپی مثبت گزارش شد، به‌صورت حدواسط به پنی‌سیلین مشاهده شد که به‌صورت مقاوم به پنی‌سیلین در نظر گرفته شد.

شیوع بالای آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، سفتریاکسون و سفالکسین نشان‌دهنده مصرف بیش از حد کلاس‌های مختلف سفالوسپورین‌هاست. در بیشتر مطالعات، نتایج مورد بررسی در ارزیابی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی با روش‌های ژنوتیپی انجام و گزارش شده است [22]. این در حالی است که برای غربالگری فنوتیپی سویه‌های مقاوم به پنی‌سیلین از دیسک پنی‌سیلین به روش دیسک‌دیفیوژن استفاده می‌شود که اگر دارای هاله کمتر از 29 میلی‌متر باشد، مقاوم به

References

- [1] Gillaspay AF, Iandolo JJ. Staphylococcus. In: Schaechter M, editor. Encyclopedia of Microbiology (Third Edition). Oxford: Academic Press. 2009; p. 293-303.
- [2] Török E, Day N. Staphylococcal and streptococcal infections. Medicine. 2005; 33(5): 97-100.
- [3] Lansing MP, Harley JP, Klein DA. Microbiology. Dubuque, IA: McGraw-Hill Higher Education, 2005.
- [4] Borst P. Genetic mechanisms of drug resistance: a review. Acta Oncologica. 1991; 30(1): 87-105.
- [5] Owens WE, Watts JL. Antimicrobial susceptibility and β -lactamase testing of staphylococci isolated from dairy Herds1. Journal of Dairy Science. 1988; 71(7): 1934-9.
- [6] El Feghaly RE, Stamm JE, Fritz SA, Burnham C AD. Presence of the blaZ beta-lactamase gene in isolates of Staphylococcus aureus that appear penicillin susceptible by conventional phenotypic methods. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2012; 74(4): 388-93.
- [7] Vesterholm-Nielsen M, Olholm Larsen M, Elmerdahl Olsen J, Moller Aarestrup F. Occurrence of the blaZ gene in penicillin resistant Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis in Denmark. Acta Vet Scand. 1999; 40(3): 279-86.
- [8] Navarre WW, Daefler S, Schneewind O. Cell wall sorting of lipoproteins in Staphylococcus aureus. Journal of Bacteriology. 1996; 178(2): 441-6.

- [9] Zervosen A, Lu WP, Chen Z, White RE, Demuth TP, Frère JM. Interactions between Penicillin-Binding Proteins (PBPs) and two novel classes of PBP inhibitors, arylalkylidene rhodanines and arylalkylidene iminothiazolidin-4-ones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004; 48(3): 961-9.
- [10] Livermore DM. Radiolabelling of penicillin-binding proteins (PBPs) in intact *Pseudomonas aeruginosa* cells: consequences of β -lactamase activity by PBP-5. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1987; 19(6): 33-42.
- [11] Leski TA, Tomasz A. Role of penicillin-binding protein 2 (PBP2) in the antibiotic susceptibility and cell wall cross-linking of *Staphylococcus aureus*: evidence for the cooperative functioning of PBP2, PBP4, and PBP2A. *Journal of Bacteriology*. 2005; 187(5): 1815-24.
- [12] Livorsi DJ, Crispell E, Satola SW, Burd EM, Jerris R, Wang YF, et al. Prevalence of blaZ gene types and the inoculum effect with cefazolin among bloodstream isolates of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012; 56(8): 4474-7.
- [13] Clinical and Laboratory Standards Institute. Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters, 3rd ed. CLSI M23-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2008.
- [14] Bennett PM, Chopra I. Molecular basis of beta-lactamase induction in bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1993; 37(2): 153-8.
- [15] Sidhu MS, Heir E, Leegaard T, Wiger K, Holck A. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with β -Lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002; 46(9): 2797-803.
- [16] Rosato AE, Kreiswirth BN, Craig WA, Eisner W, Climo MW, Archer GL. mecA-blaZ corepressors in clinical staphylococcus aureus isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003; 47(4): 1460-3.
- [17] Hisatsune J, Hirakawa H, Yamaguchi T, Fudaba Y, Oshima K, Hattori M, et al. Emergence of staphylococcus aureus carrying multiple drug resistance genes on a plasmid encoding exfoliative toxin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013; 57(12): 6131-40.
- [18] Chong YP, Park SJ, Kim ES, Bang KM, Kim MN, Kim SH, et al. Prevalence of blaZ gene types and the cefazolin inoculum effect among methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* blood isolates and their association with multilocus sequence types and clinical outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015; 34(2): 349-55.
- [19] Trouillet-Assant S, Valour F, Mouton W, Martins-Simões P, Lustig S, Laurent F, et al. Methicillin-susceptible strains responsible for postoperative orthopedic infection are not selected by the use of cefazolin in prophylaxis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*.
- [20] Li J, Echevarria KL, Hughes DW, Cadena JA, Bowling JE, Lewis JS. Comparison of cefazolin versus oxacillin for treatment of complicated bacteremia caused by methicillin-susceptible staphylococcus aureus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014; 58(9): 5117-24.
- [21] Wi YM, Park YK, Moon C, Ryu SY, Lee H, Ki HK, et al. The cefazolin inoculum effect in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* blood isolates: their association with dysfunctional accessory gene regulator (agr). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2015; 83(3): 286-91.
- [22] Qian M, Tang S, Wu C, Wang Y, He T, Chen T, et al. Synergy between baicalein and penicillins against penicillinase-producing *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*. 2015; 305(6): 501-4.
- [23] Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 24th informational supplement. CLSI M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2014.
- [24] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 9th ed. CLSI M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2012.
- [25] Khalili H, Soltani R, Negahban S, Abdollahi A, Gholami K. Reliability of disk diffusion test results for the antimicrobial susceptibility testing of nosocomial gram-positive microorganisms: Is E-test Method Better? *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*. 2012; 11(2): 559-63.
- [26] King A, Brown DF. Quality assurance of antimicrobial susceptibility testing by disc diffusion. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001; 48(1): 71-6.
- [27] Aihara M. [Quality control on antimicrobial susceptibility testings]. *Rinsho byori The Japanese Journal of Clinical Pathology*. 2000; Suppl 111: 142-9.
- [28] Hendriksen RS, Seyfarth AM, Jensen AB, Whichard J, Karlsmose S, Joyce K, et al. Results of use of WHO Global Salm-Surv external quality assurance system for antimicrobial susceptibility testing of Salmonella isolates from 2000 to 2007. *J Clin Microbiol*. 2009; 47(1): 79-85.
- [29] Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Ringertz S. Antimicrobial susceptibility testing in Sweden. IV. Quality assurance. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases Supplementum*. 1997; 105: 24-31.

Molecular study of the blaZ Staphylococcus aureus gene isolated from clinical samples

Mohammad Bokaeian¹, Hamed Tahmasebi^{2*}, Javad Adabi², Alireza Mohammad Zadeh³, Jalal Mardaneh³

1. Associate Professor, PhD in Bacteriology, Department Microbiology, School of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Center of Infectious Diseases & Tropical Zahedan, Zahedan, Iran

2. MSc Student in Microbiology, Department of Microbiology, School of Medicine, Zahedan University of Medical Science, Zahedan, Iran

3. Associate Professor, PhD in Bacteriology, Department Microbiology, School of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran

Abstract

Background: Bacterial resistants to beta-lactam antibiotics are steadily expanding. Excessive consumption beta-lactam antibiotics in the treatment of related Staphylococcus aureus infections caused the emergence of beta-lactamase enzymes in strains. Identification and analysis of molecular characteristics of these strains can be effective to select on the appropriate antibiotic treatment.

Materials and Methods: Initially, the isolates collected from clinical samples were screened by biochemical tests. After the whole Staphylococcus aureus resistance to beta-lactam antibiotics were evaluated by used of molecular-specific primers.

Results: Of 496 isolates obtained from different clinical samples, 147 isolates were identified as *S. aureus*. The highest resistance to the antibiotics had related to penicillin, Oxacillin, Cefocithin and the lowest resistance antibiotics had related to Vancomycin. From the 147 samples, 143 samples were blaZ genes that allocated to over 97%.

Conclusion: According to the results of molecular tests, in the Zahedan spread of carrier-lactamase strains is very high. Treatment of all staphylococcal infections of beta lactam antibiotics are not used as much as possible to the access to early treatment prevented the increase in resistant strains.

Received:2017/08/03

Accepted:2017/10/28

Keywords: antibiotic resistance, Beta-lactam, blaZ, staphylococcus aureus.